EFFICACITE D'UNE PHYTASE SUR LA DIGESTIBILITE ILEALE APPARENTE DU PHOSPHORE CHEZ LA POULE PONDEUSE

Philipps Petra, Raffaella Aureli, Fidelis Fru

DSM Nutritional Products France, Centre de Recherche en Nutrition Animale, BP 170, 68305 Saint Louis Cedex, France

RÉSUMÉ

Les poules pondeuses ont besoin, pour la production d'œufs et leur entretien, d'un apport en phosphore. La majeure partie du phosphore dans l'aliment étant présent sous forme phytique, non hydrolysé dans l'intestin, l'ajout de phytase microbienne présente un avantage. Les effets d'une phytate 6-phosphatase (phytase) destinée à des aliments présentés en farine, a été testée lors d'un essai de digestibilité de quatre semaines chez la poule pondeuse. 168 poules pondeuses Isa Brown âgées de 22 semaines ont été réparties en 84 groupes de 2 poules. Les poules ont été nourries avec un aliment de base en farine, composé de maïs et de tourteau de soja, contenant 3,2 g de phosphore total (P) et auquel 0, 600, 900 et 1200 U de phytase par kg d'aliment ont été ajoutées. Un marqueur indigestible, le dioxyde de titane (TiO_2), a été inclus dans l'aliment pour calculer l'utilisation iléale apparente des minéraux. A la fin de l'étude, les animaux ont été sacrifiés et la partie terminale de l'iléum de chaque poule a été prélevée pour la détermination de la teneur en P et en TiO_2. L'addition de doses croissantes de phytase dans l'aliment a permis d'améliorer significativement l'utilisation iléale apparente du P ($p<0,01$). Des améliorations de 34 % et 47 % ont été respectivement obtenues pour des doses de phytase de 600 et 1200 U/kg. La réponse à l'addition phytase sur l'utilisation iléale apparente de P peut être décrite par une courbe de régression non linéaire. La courbe $y=46 + 25,1 (1-e^{-0,0017x})$, $R^2=0,99$ décrit clairement un effet dose réponse de la phytase sur l'utilisation iléale apparente de P. L'addition de 900 $U.kg^{-1}$ de phytase permet une amélioration significative de 11,6 % du pourcentage de cendres.

ABSTRACT

Phosphorus (P) is a key element to the maintenance and production of eggs by laying hens. As most of the P present in feed is not directly available, phytate 6-phosphatase (phytase) supplementation could be beneficial. In this study the effects of the microbial phytase on the utilisation of P by laying hens was evaluated over 4 weeks. 168 laying hens (22 weeks of age) were divided into 84 groups of two hens. The birds were fed a mash diet based on maize and soybean meal containing 3.2 g total phosphorus. The basal feed was supplemented with 0, 600, 900 and 1200 U of phytase per kg feed. In addition, 0.1% of titanium dioxide (TiO_2) was added as an indigestible marker in order to determine the apparent ileal utilisation of phosphorus and calcium. At the end of the study, the animals were sacrificed and the terminal part of the ileum was collected in order to determine the P and TiO_2 concentration. Supplementation with 600 and 1200 $U.kg^{-1}$ resulted in significant ($p<0.01$) increase of 34 % and 47 % in P utilisation respectively. The dose-dependant response of the apparent ileal utilisation of phosphorus to the addition of phytase could be described by the following equation: $y=46 + 25.1 (1-e^{-0.0017x})$, $R^2=0.99$. This study also reports a significant increase of 12% in tibia ash when 900 U of phytase per kg feed were added to the diet.

INTRODUCTION

Les poules pondeuses ont besoin d'un apport en phosphore aussi bien pour leurs besoins d'entretien que pour leurs besoins de production. Cependant, la majeure partie du phosphore végétal est présent sous forme de phytate et n'est pas utilisable par les animaux monogastriques. En effet, ceux ci ne possèdent pas de phytase, l'enzyme responsable de l'hydrolyse du phytate en inositol phosphate facilement assimilable. De plus, l'addition de phosphore inorganique dans les régimes alimentaires pour répondre aux besoins physiologiques des animaux, conduit souvent à un excès de phosphore excrété dans le fumier. L'addition de phytase microbienne dans la ration alimentaire apparaît donc comme une solution pour améliorer la disponibilité du phosphore phytique et réduire l'apport de phosphore minéral. Plusieurs études (Van Der Klis *et al*., 1997 ; Panda *et al*., 2005) ont montré qu'en plus d'une diminution de phosphore dans les excréments, l'addition de phytase dans un aliment déficient en phosphore permet une amélioration de l'absorption iléale du phosphore, de la production d'œufs et une augmentation du taux de cendres des tibias chez la poule pondeuse. Cette étude propose d'évaluer l'efficacité de dose croissante d'une phytase, sur la digestibilité iléale apparente du phosphore chez la poule pondeuse nourrie avec un aliment très pauvre en phosphore.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Animaux

Cette étude a été réalisée au Centre de Recherche en Nutrition Animale de DSM Nutritional Products France sur des poules pondeuses Isa Brown agées de 22 semaines réparties en 84 groupes de 2 poules. Le traitement témoin ainsi que les trois traitements additionnés de phytase ont été répétés 12 fois, chaque répétition étant constituée de deux poules logées dans la même cage. L'essai s'est déroulé pendant quatre semaines dans des conditions de température et d'humidité contrôlées. Les animaux avaient accès à l'eau et à l'aliment *ad libitum.* Chaque groupe de poules a été pesé au début et à la fin de l'étude expérimentale. L'aliment a été pesé afin de calculer l'ingestion journalière. Les œufs de chaque groupe ont été récoltés et pesés une fois par semaine pour calculer les performances de ponte des poules pondeuses au cours de l'essai (poids des œufs, taux de ponte). Après 4 semaines, les 2 poules de chaque cage ont été sacrifiées et la partie terminale de l'iléum (entre 17 et 2 cm en amont de la jonction iléo-caecale) de chaque poule a été prélevée afin de récupérer le contenu intestinal qui a été lyophilisé pour la détermination de la teneur en dioxyde de titane (TiO_2), en calcium (Ca) et en phosphore (P) total. En parallèle le tibia droit de chaque animal a été prélevé pour la détermination du pourcentage de cendres des os.

1.2. Aliment

Les poules ont été nourries deux semaines avant le début de l'essai avec un aliment de base en farine composé de maïs et de tourteau de soja contenant 3,2 g de P total et 28,3 g de Ca par kg d'aliment. Cet aliment a été formulé de manière à répondre aux besoins nutritionnels des poules pondeuses tout en restant faible en phytase endogène et en présentant un déficit en P total pour évaluer les effets de l'addition d'une phytase. (Tableau 1). Pendant les quatre semaines de l'étude, les poules ont été nourries avec le même aliment de base auquel des doses croissantes de phytase ont été ajoutées. La phytase RONOZYME® NP (M) (phytate 6-phosphatase produite à partir d' *Aspergillus oryzae*) a été formulée de manière à être utilisée exclusivement dans un aliment sous forme de farine et a été testée aux niveaux d'inclusion de 0, 600, 900 et 1200 U par kg d'aliment. De plus, du TiO_2 a été ajouté à l'aliment à une teneur de 1 g par kg comme marqueur indigestible pour calculer l'utilisation iléale apparente de P et de Ca.

1.3. Analyses biochimiques

Les analyses des nutriments dans l'aliment ont été réalisées en suivant les méthodes standards classiques de détermination (VDLUFA 1976). La détermination de la teneur en Ca, P et TiO_2 dans l'aliment et les échantillons de contenus intestinaux a été réalisée par spectrométrie d'émission plasma (DIN EN ISO 1998) après une minéralisation HNO_3 / H_4FN aux micro ondes. Les utilisations iléales apparente de P (U.app. P) et de Ca (U.app. Ca) (en % d'ingestion)) ont été calculées de la manière suivante :

$$\mathbf{100 - 100 \times \{[TiO_{2\,A}] / [TiO_{2\,CI}]\} \times \{[X_{CI}] / [X_A]\}},$$

où $[TiO_{2\,A}]$ et $[TiO_{2\,CI}]$ sont les concentration en dioxyde de titane respectivement dans l'aliment et le contenu iléal, où $[X_{CI}]$ et $[X_A]$ sont les concentrations en nutriment X dans le contenu iléal et l'aliment respectivement.

Les tibias prélevés ont été congelés à –20°C jusqu'à l'analyse. Sur chaque tibia, un fragment de 2 cm de la partie centrale de la diaphyse de l'os a été découpé. Ce fragment a été débarrassé de la moelle et utilisé pour déterminer la résistance osseuse définie comme la force d'écrasement en Newton à appliquer au fragment pour atteindre le point de rupture, grâce à un appareil de type Instron (Lloyd LR10K). Le pourcentage de cendres des os a été déterminé après dégraissage des fragments d'os

dans l'éthanol et dans l'éther, séchage à l'étuve à 105°C et incinération à 550°C dans un four à moufle.

1.4. Analyses statistiques

Une analyse de variance à un facteur (ANOVA 1) a été utilisée afin d'évaluer statistiquement l'utilisation iléale apparente de P et de Ca ainsi que le pourcentage de cendres dans les tibias, grâce au logiciel Stat box V.5 (Grimmersoft 1995). Les moyennes significativement différentes ($p<0,05$) ont été comparées grâce au test de Newman Keuls. Si la lettre attribuée aux deux moyennes de chaque paire est identique alors la différence observée n'est pas statistiquement significative. Inversement, si la lettre attribuée aux deux moyennes de chaque paire diffère, la différence est significative.

Une analyse de régression non linéaire a été réalisée en utilisant le programme Origin 7,0. Un model exponentiel du type **$y= a + b\ (1\text{-}exp^{(-k\ x)})$** a été appliqué aux données, avec
a: réponse obtenue sans addition de phytase
b :réponse maximale à l'addition de phytase
k :paramètre décrivant la pente de la courbe
x :addition de phytase en $U.kg^{-1}$
y :réponse (utilisation du phosphore)

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Le détail de la composition de l'aliment de base et des valeurs analysées en nutriments et en énergie métabolisable est présenté dans le Tableau 1. Les poules pondeuses ont été nourries avec un aliment contenant 144 g de protéines brutes et 12,1 MJ par kg d'aliment d'énergie métabolisable.
Les résultats d'analyse de l'activité de la phytase dans les différents traitements alimentaires sont présentés dans le Tableau 2. La phytase native présente dans l'aliment est inférieure à 50 $U.kg^{-1}$. L'activité de la phytase analysée dans l'aliment correspond aux dosages cibles.
Le niveau de P non phytique (NPP) déterminé en faisant la différence entre la teneur en P total et la teneur en P phytique était de 1,1 g NPP par kg d'aliment. Ce niveau est inférieur aux recommandations NRC (1994) de 2.5 g NPP par kg d'aliment. Néanmoins dans cette étude comme celle décrite par Rama Rao *et al* (1999), la faible teneur en NPP n'a pas affecté la production d'œufs du groupe témoin et une amélioration de la production a été enregistrée avec l'addition de phytase (Tableau 3). Van der Klis *et al* (1997) ont observé au contraire une diminution importante de la production d'œufs de poules nourries avec un aliment contenant 1.2 $g.kg^{-1}$ NPP.
Les résultats de l'utilisation iléale apparente de Ca et de P sont détaillés dans le Tableau 4. L'utilisation iléale apparente de P a été significativement améliorée par l'addition de doses croissantes de phytase par rapport au traitement témoin. L'utilisation apparente de P a été augmentée, passant de 46.0% (groupe témoin) à 67.5 % par l'addition de phytase. La réponse de l'utilisation iléale apparente de P à l'addition de la phytase a pu être décrite par une courbe de régression non linéaire. La courbe $y=46 + 25,1\ (1-e^{-0,0017x})$, $R^2=0,99$ décrit clairement un effet dose réponse de la phytase sur l'utilisation iléale apparente de P (Figure 1). En plus de l'utilisation du phosphore, celle du calcium a aussi été améliorée par l'ajout de phytase (Van der Klis *et al*., 1997) et de manière significative par rapport au groupe témoin. Cependant, il n'y avait pas de différences significatives entre les différentes doses de phytase testées. L'augmentation de la disponibilité du P et du Ca a eu un effet sur la minéralisation osseuse (Tableau 5). En effet, l'addition de phytase dans un aliment contenant 1.1 $g.kg^{-1}$ NPP a permis d'augmenter significativement le pourcentage de cendres des tibias et d'améliorer la résistance osseuse. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par Panda *et al*., 2005.

CONCLUSION

Le principal objectif de cette étude expérimentale était de déterminer les effets de l'addition de phytase sur l'utilisation iléale apparente de P chez la poule pondeuse. L'étude a montré que l'ajout de phytase dans un aliment contenant 1.1 $g.kg^{-1}$ NPP permet de maintenir les performances de ponte. Cette phytase présente en plus l'avantage d'améliorer l'utilisation iléale apparente de P quelque soit la dose utilisée et cela de manière dose dépendante, ainsi que de favoriser la minéralisation osseuse. En conclusion, l'addition de 900 U de phytase dans un aliment pour poules pondeuses permet de réduire le niveau de NPP à 1.1 g par kg d'aliment, car elle contribue à améliorer la disponibilité du P sans affecter les performances de ponte.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

EEC, 1986, Journ.Off.d.Comm.Europ., L130, 53-54
DIN EN ISO, 1998. ISO 11885 : 1997, E22
Grimmersoft, 1995. Manuel d'utilisation
Originlab Corporation, 2002.Origin Version 7, Guide de programmation

Panda A.K., 2005. Br.Poult.Sci.46 :464-469
Rama Rao, 1999. Ani.Feed Sci.Tech.79:211-222
Van der Klis J.D., 1997. Poult.Sci.76 :1535-1542

Tableau 1 : Composition de l'aliment de base

Ingrédients (%)	
Maïs	70,4
Tourteau de soja (50 % CP)	19,0
Huile de soja	1,00
DL-Méthionine	0,20
Coquilles d'huître	1,50
$CaCO_3$	6,70
NaCl	0,10
Premix	1,00
Dioxyde de titane	0,10
Teneurs analysées:	
Protéine brute (g/kg)	143,9
Energie métablisable (MJ/kg)	12,1
Calcium (g/kg)	28,3
Total P (g/kg)	3,2
P non phytique (mg/kg)	1,1

Tableau 2 : Activité de la phytase dans les échantillons d'aliment

Traitement	**Produit**	**Dose (U/kg)**	**Activité phytasique (U/kg aliment)**
A	Contrôle	-	<50
B	phytase	600	596
C	phytase	900	1012
D	phytase	1200	1238

Une unité de phytase (U) correspond à l'hydrolyse d'1µmol d'inositol phosphate à partir de 0,5Mm de phytate par minute à un pH de 5,5 et à 37°C

Tableau 3 : Performances de ponte

Produit	**Témoin**	**Phytase**		
Traitement	A	B	C	D
Dose (U / kg)	-	600	900	1200
Cages x poule	12 x 2	12 x 2	12 x 2	12 x 2
Production oeufs (%)	**91.1** [A]	**97.4** [A]	**98.8** [A]	**94.6** [A]
	± 5.4	± 12.3	± 31.9	± 5.4
%	*100*	*106.9*	*108.5*	*103.8*

Tableau 4 : Utilisation iléale apparente du P et du Ca

Produit	**Témoin**	**Phytase**		
Traitement	A	B	C	D
Dose (U / kg)	-	600	900	1200
Cages x poule	12 x 2	12 x 2	12 x 2	12 x 2
U. app. P	**46,0** [B]	**61,6** [A]	**65,8** [A]	**67,5** [A]
(%)	± 11,4	± 10,2	± 9,3	± 8,7
%	*100*	*133,9*	*143,0*	*146,7*
U.app. Ca	**64,3** [B]	**81,3** [A]	**86,2** [A]	**82,9** [A]
(%)	± 21,0	± 15,3	± 5,5	± 7,0
%	*100*	*126,4*	*134,1*	*128,9*

Tableau 5 : Résistance osseuse et taux de cendres dans les tibias

Produit	**Témoin**	**Phytase**		
Traitement	A	B	C	D
Dose (U / kg)	-	600	900	1200
Cage x poule	12 x 2	12 x 2	12 x 2	12 x 2
Résistance	**39** [A]	**49** [A]	**54** [A]	**50** [A]
(N)	± 6,9	± 12,7	± 8,3	± 8,5
%	*100*	*125,6*	*138,5*	*128,2*
Cendres (%)	**45,0** [B]	**49,2** [A]	**50,1** [A]	**47,8** [A]
	± 1,58	± 0,85	± 1,48	± 1,21
%	*100*	*109,3*	*111,6*	*106,1*

Figure 1 : Régression non linéaire de l'utilisation iléale apparente du P (moyenne ± écart sur la moyenne)

